DOI:10.11931/guihaia.gxzw201905020

探讨植物单染色体测序中的假阳性问题

王发明，莫权辉，叶开玉，龚弘娟，刘平平，蒋桥生，齐贝贝，李洁维*

（广西植物功能物质研究与利用重点实验室，广西壮族自治区 中国科学院 广西植物研究所，广西 桂林 541006）

摘要：单细胞测序技术目前广泛应用于人类、动物、微生物等物种的研究上，但在植物界，因为细胞壁的存在，使得单细胞测序技术在植物上的应用举步维艰。如果能分离出植物单条染色体，然后应用单细胞测序技术进行扩增和测序，可以避免细胞壁的干扰，具有重要的应用价值。科研人员一直尝试针对单条植物染色体进行测序，但目前还未见成功的报道，也未见有文章对失败的原因进行讨论。本研究以六倍体中国春小麦为材料，针对使用单细胞测序技术进行单染色体扩增过程中出现的假阳性问题进行了研究和探讨，分析了单染色体扩增失败的主要原因。并通过高通量测序技术对外源污染的可能来源进行了研究，表明在对实验器具、耗材、环境污染严格防控的基础上，人体接触可能是造成污染的主要来源。同时推测单染色体扩增失败可能是因为染色体自身超螺旋状态造成引物难以结合和复制，并针对存在的问题提出了可行性建议。本研究为将来成功进行单染色体测序提供了有益的借鉴。

关键词：单染色体，单细胞测序，外源污染，假阳性，MDA，MALBAC

中图分类号：Q943　　　　**文献标识码：**A

Problem of false positives existing in plant single chromosome sequencing

WANG Faming, MO Quanhui, YE Kaiyu, GONG Hongjuan, LIU Pingping, JIANG Qiaosheng, QI Beibei, LI Jiewei*

（*Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Science*, Guilin 541006, Guangxi, China）

Abstract: Single-cell sequencing technology is widely used in the research of human, animal, microorganism and other species, but it is hard to be applied in plant because of being cell wall. If a single chromosomes can be separated from a plant cells and then were used for amplification and sequencing with single-cell sequencing technique, the barrier of plant cell wall will be removed and be of important application value. However, there are to date no claims on the successful application of single chromosome sequencing, and the causes of the failure are poorly understood. The issue of false-positives that commonly exist in single chromosome amplification was studied, and the main causes of the failure in single-chromosome amplification were discussed. Besides, the

基金项目：国家自然科学基金地区科学基金项目(31560509)；中科院“西部之光青年学者”项目（A类）；广西植物研究所基本业务费项目（桂植业 19002）[Supported by the Fund for Less Developed Regions of the National Natural Science Foundation of China（31560509）；Young Scholar of CAS "Light of West China" Program(Category A Projects)；Fundamental Research Funds of GXIB(19002)]。

作者简介：王发明（1979-），男，山东日照人，博士，副研究员，主要从事植物分子遗传学研究，（Email）wfm_rz@163.com。

***通信作者：**李洁维，研究员，主要从事果树栽培与良种选育，（Email）lijw@gxib.cn。

probable sources of exogenous pollution in chromosome amplification were studied with high-throughput sequencing, and human body was proved to be the most probable sources of pollution on the basis of all experimental tools, materials, reagents and spaces being under extremely sterilized treatments. The super helical structure of chromosomes themselves was considered as the primary cause of failure in amplification, as primers were hard to bind to strands of DNA to start replication. Finally, some feasible suggestions were put forward. This study provides beneficial lessons for the successful single-chromosome sequencing in the future.

Key words: single chromosome, single-cell sequencing, exogenous pollution, false positives, MDA, MALBAC

单细胞测序技术是目前生命科学研究的热点技术之一。其可以在单个细胞水平上，使用极微量模板对基因组、转录组和表观组等进行高通量测序分析，从而可以获得用常规组织样本无法获得的单个细胞的异质性信息，被广泛应用于人类的疾病诊断、癌症的早期检测以及发育生物学、微生物学和神经生物学等方面（Huang et al., 2015; Navin et al., 2011; Lasken, 2007）。目前单细胞全基因组测序普遍使用的技术包括多重置换扩增技术（multiple displacement amplification，MDA）（Hosono et al., 2003）和基于多次退火环状循环的扩增技术（multiple annealing and looping-based amplification cycles，MALBAC）（Zong et al., 2012）。单细胞测序技术目前已广泛应用于人类、动物和微生物等方面的研究，但在植物上的研究应用较少，主要原因是植物存在细胞壁，使用普通方法难以进行分离和裂解。严建兵团队（Li et al., 2015）曾发展出了一种简单可行的方法，成功分离出玉米小孢子四分体，并使用单细胞测序技术成功进行了全基因组测序，获得了多个创新性的科学发现。这也是单细胞测序技术在植物上的首次成功应用。但单细胞测序技术在染色体水平上的应用还未见成功的报道。

植物染色体是植物细胞在有丝分裂或减数分裂时的超螺旋存在形式，是染色质的高级结构，容易分辨和分离。那么能否利用单细胞测序技术来进行单条植物染色体的体外扩增和测序呢。单细胞测序技术可以对单个微生物细胞进行测序，多数细菌基因组大小不足十兆，远低于很多植物单条染色体的大小，因此利用单细胞测序技术进行植物单染色体测序从理论上可行。通过分离染色体进行体外扩增，可以避免细胞壁的干扰，目前已有较多分离单条染色体并进行体外扩增的成功案例，但使用的主要是基于 PCR 的全基因组扩增技术，如简并寡核苷酸引物扩增技术（DOP-PCR）（Telenius et al., 1992）和接头介导的 PCR 扩增技术（LA-PCR）（Chen & Armstrong, 1995），但这些技术存在非特异性扩增、扩增偏倚和扩增结果基因组覆盖度低等问题。如果能使用单细胞测序技术进行植物单条染色体的扩增，则可以从根本上解决这些问题，具有可预期的广阔应用前景。但目前关于这方面研究的报道较少，殷卉等(2015)在巴西橡胶树上尝试应用单细胞测序技术对橡胶树单条染色体进行体外扩增，但一直未见后续报道。

植物单条染色体的体外扩增除了对极微量模板的考验外，外源污染的防控也是该技术应用的重要环节，如何有效防控外源污染，是微量模板能否正确扩增和保证后续测序质量的关键因素。但是基于 MDA 和 MALBAC 技术的扩增敏感性，即使极微量外源核苷酸模板的存在也可能造成污染的扩增和放大，从而造成假阳性现象和导致扩增失败。扩增过程中外源污染可能来源于试验环境，也可能来自实验试剂、水、各种缓冲液，扩增使用的枪头、离心管等耗材器具以及染色体制备和分离过程中使用的玻片、玻璃针等（王发明等，2010）。除此以外，实验室环境下的气溶胶污染也不容忽视（杜茜等，2015）。因此在植物单染色体体外扩增的各个环节都应该对外源污染进行严格防控，才能保证扩增的高质量。

目前单染色体测序还没有成功的报道，笔者在同测序公司和其他单位相关领域人员交流时，发现普遍存在假阳性现象严重，而目标染色体没有得到有效扩增的问题。针对这种问题，尚未有人进行过系统研究和提出可行性建议，特别是对假阳性现象形成的原因和污染的主要来源认识不足，不利于有针对性的提出外源污染防控策略和改进实验方案。

本研究尝试使用单细胞测序的方式对小麦单条染色体进行分离后进行体外扩增和测序，在严格防控外源污染的前提下，针对实验过程中普遍遇到的假阳性问题进行研究，探讨其可能来源和形成原因，并针对单染色体测序存在的主要问题提出可行性建议，以为植物单染色体测序的开展提供经验和参考。

1 材料和方法

1.1 植物材料

六倍体中国春小麦（2n=6×=42）种子，由中国科学院遗传与发育生物学研究所王道文课题组提供。

1.2 方法

1.2.1 小麦中期染色体制备和单条染色体分离

将六倍体中国春小麦种子用冷水于 4 ℃冰箱浸泡 1 d 后，置于 25 ℃下避光培养，当其根尖长至 1.5~2.0 cm 时，用锋利的刀片将其切下，用 0.1%秋水仙素预处理 3 h，无菌水洗净后用卡诺固定液（冰醋酸：纯酒精=1：3）于低温下固定 5 min，转入 70%酒精中，4 ℃冰箱保存。使用时用镊子取出所需数量根尖，无菌水冲洗 3 遍，控干水分。分别加入体积比 4%和 3%的纤维素和果胶酶 20 μL，37 ℃ 酶解 45 min，酶解完成后，用无菌水冲洗 3 遍，控干水分，滴加 10 μL 卡宝品红染液，用枪头将根尖捣碎，略放置后进行压片。压片完成后的玻片置于-70 ℃超低温冰箱放置 30 min，迅速揭掉盖玻片，置于倒置显微镜下观察和使用微细玻璃针法进行显微分离（Nikon Ti-S 研究级倒置显微操作系统）。在分离单条染色体的同时，分离包含全部中期染色体的单个完整细胞作为对照。

1.2.2 染色体 MALBAC 扩增

分离后的包含全部染色体的单个完整细胞和单条小麦染色体使用亿康公司的 MALBAC 微量基因组快速扩增试剂盒(KT110700324)进行扩增。操作过程详见使用说明书 http://www.yikongenomics.com/upload/2017/1124/KT1107003_MALBACweiliangjiyinzukuaisukuozengshijihechanpinshuomingshu_zhongwenPM-40c9e.pdf。根据说明书分别将扩增循环数设置为适合单条染色体扩增的 21 个循环和常规的 17 个循环。扩增完成后使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 染色体 MDA 扩增

分离后的包含全部染色体的单个完整细胞和单条小麦染色体使用 Qiagen 公司的 REPLI-g Single Cell Kit（Cat No./ID: 150343）进行扩增，操作过程详见使用说明书 https://www.qiagen.com/cn/resources/resourcedetail?id=38faca1c-64b0-4281-aab3-aa8324bbd181&lang=en。扩增完成后使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。在使用试剂盒自行体外扩增的同时，使用安诺优达基因科技有限公司提供的解离液在分离部分单条染色体后委托其进行体外扩增。

1.2.4 污染源排除实验

为了研究染色体扩增过程中的假阳性现象和对外源污染的可能来源进行排除，我们委托亿康基因公司使用MALBAC技术对实验使用的无菌水、PBS溶液、离心管和试剂盒本身进行了检测。试验设计如下：

表1 污染源排除实验设计

Table 1 Experimental design for screening pollution source

实验 Test	样本 Samples	耗材 Materials	试剂 Kits
实验1 Test 1	送检的PBS和水以及空白各重复2次 The suspected PBS, water and blank control, each repeated twice	0.2 ml PCR管 0.2 ml PCR tubes	合格试剂（1806B） Qualified kit (1806B)
实验2 Test 2	送检的PBS和水以及空白各重复2次 The suspected PBS, water and blank control, each repeated twice	质量部0.2 ml PCR管 Qualified 0.2 ml PCR tubes	合格试剂（1806B） Qualified kit (1806B)

实验3 Test 3	质量部的无核酸酶水和空白各重复2次 Qualified nuclease-free water and blank control, each repeated twice	0.2 ml PCR管 Test sample of 0.2 ml PCR tubes	合格试剂（1806B） Qualified kit (1806B)
实验4 Test 4	质量部的无核酸酶水和空白各重复2次 Qualified nuclease-free water and blank control, each repeated twice	质量部0.2 ml PCR管 Qualified 0.2 ml PCR tubes	送检的1702A试剂 The suspected kit (1702A)

注：由实验 1 和实验 2 比对可得出是否是 0.2 ml PCR 管原因导致污染；由实验 1 和实验 3 比对可得出是否是送检样本（水和 PBS）原因导致污染；由实验 2 中的空白对照和实验 4 中的空白对照得出是否是试剂原因导致污染。

Note：It can be concluded whether the 0.2 ml PCR tube was contaminated or not by comparing experiment 1 and experiment 2; it can be concluded whether the pollution caused by the samples (water and PBS) by comparing experiment 1 and experiment 3; the blank control in experiment 2 and experiment 4 were used to determine whether the contamination was caused by reagents.

1.2.5 SCoT 分子标记检测

SCoT 分子标记是一种目标起始密码子多态性标记，因此可以检测外源污染物是来自其他外源物种基因还是由于引物多聚体形成。SCoT 引物根据 Collard & Mackill (2009)和 Luo et al.(2011)公布的引物序列合成。本研究用于单染色体扩增产物的 PCR 检测的 SCoT 引物见表 2。

表 2 用于检测单染色体扩增产物的 SCoT 引物

Table 2 SCoT primers used for checking single-chromosome amplification products

SCoT引物 SCoT primes	序列（5′-3′） Sequence(5′-3′)
P17	ACCATGGCTACCACCGAG
P20	ACCATGGCTACCACCGCG
P21	ACGACATGGCGACCCACA

使用 20 μL 反应体系：包括 2×Taq PCR Mix 10 μL，扩增产物(稀释 1 000 倍，约 30 ng·μL^{-1}) 1.0 μL、10 μmol L^{-1} 引物 0.8 μL，超纯水 8.2 μL。反应程序：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 45 s，50 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 2 min，循环 35 次；72 ℃延伸 10 min。取 8 μL 扩增产物，使用 2%的琼脂糖电泳检测。

1.2.6 Southern 杂交鉴定

将小麦全基因组 DNA 酶切产物与染色体扩增产物及阴性对照一起进行电泳，并通过印记杂交的方式转移至带正电荷 Hybond 尼龙膜上，小麦全基因组 DNA 经酶切、标记后作为探针进行杂交。具体操作步骤参照罗氏公司生产的“DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter-Kit Ⅰ (Roche)”试剂盒说明书进行。

1.2.7 高通量测序

选择小麦染色体假阳性扩增产物，构建单细胞基因组 MDA 类型文库，文库质检合格后，使用 Illumina 测序平台进行高通量测序，测序读长 PE150。对过滤后的高质量数据随机抽取 10000 条 Reads 数据，通过 Blast 软件比对 NT 库，分析可能的污染源。

2 结果

2.1 小麦中期染色体制备和显微分离

在 40 倍镜下，寻找到分散良好，视野清晰的小麦中期染色体分裂相，制备微细玻璃针，使用显微操作仪准确挑出单条小麦染色体。染色体通过静电作用吸附在针尖上，迅速转移至放有裂解液的 200 μL 离心管中，8 000 r•min^{-1} 简短离心 20 s，进行后续扩增实验。

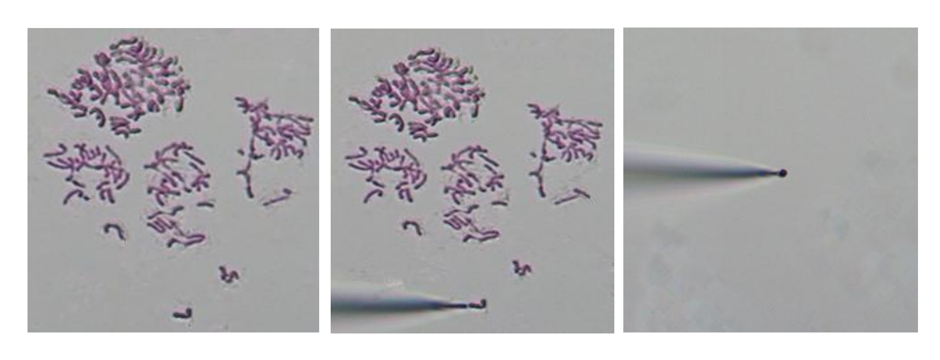
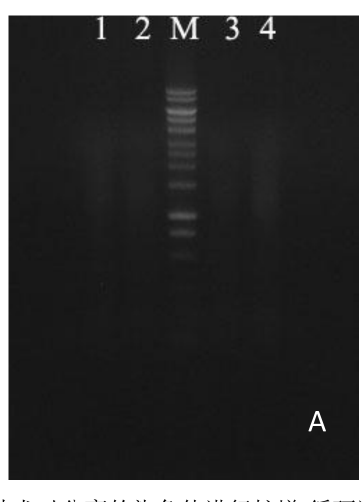


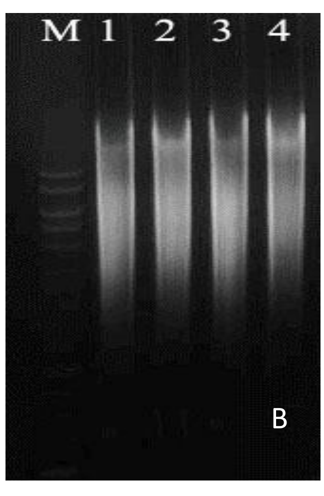
图 1 单条小麦染色体的分离过程

Fig. 1 The isolation of single wheat chromosome

2.2 MALBAC 和 MDA 方法对小麦染色体进行扩增出现假阳性现象

分别使用基于 MALBAC 技术的 MALBAC 微量基因组快速扩增试剂盒(KT110700324)和基于 MDA 技术的 REPLI-g Single Cell Kit（Cat No./ID: 150343）进行扩增的结果显示（图 2），包含全部染色体的完整细胞的扩增条带（1 号泳道）跟单个染色体的扩增条带（2 号泳道）带型基本一致。但两种方法中无菌水阴性对照（3 号泳道）和 PBS 阴性对照（4 号泳道）也分别扩增出了与目标样品明显类似的条带。两种使用单细胞测序试剂盒进行扩增的方法均出现假阳性现象，说明扩增过程中可能存在外源 DNA 污染。





注：**A**. 使用 MALBAC 技术对分离的染色体进行扩增(循环数 21); **B**. 使用 MDA 技术对分离的染色体进行扩增。**1**. 一个完整细胞的全部染色体; **2**. 单条染色体; **3**. 无菌水阴性对照; **4**. PBS 阴性对照; M. DNA Marker-Q, 分子量大小分别为 200, 400, 600, 800, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 8 000, 10 000（bp）。

Note: A. Amplification with MALBAC technique (21 cycles); B. Amplification with MDA technique. **1**. Whole chromosomes of a single wheat cell; **2**. A single chromosome of wheat; **3**. Negative control (sterile water); **4**. Negative control (PBS solution); M. DNA Marker-Q, molecule weight is 200, 400, 600, 800, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 8 000, 10 000 (bp) respectively.

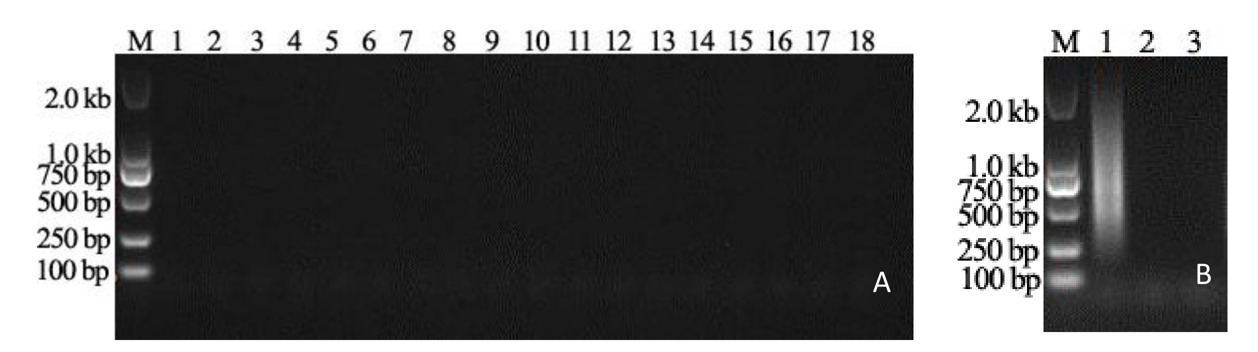
图 2 小麦染色体的体外扩增

Fig. 2 *In vitro* amplification of wheat chromosomes

2.3 可能污染源的排除

为了排除假阳性现象出现的可能原因，我们委托亿康基因公司使用 MALBAC 单细胞扩增试剂盒，针对扩增过程中使用的无菌水、PBS 溶液、离心管以及试剂盒本身分别进行了排除。实验表明，体外扩增使

用的水及各种试剂、耗材均未检测到明显扩增，没有扩增条带出现（图 3A），而阳性对照扩增出了明显条带（图 3B），说明污染在可控范围之内。但经咨询公司，得知其检测时在第二轮扩增使用的是 17 个循环，而不是本实验进行单染色体扩增使用的 21 个循环。而当我们改为 17 个循环进行扩增时，染色体及阴性对照均没有扩增出条带。说明在较高的循环数下，BALBAC 单细胞技术容易产生非特异性假阳性扩增。



注：**A** **1-6**. 实验 1 中的 PBS、水、空白各 2 次；**7-8**. 实验 3 中的水各 2 次；**9-14**. 实验 2 中的 PBS、水、空白各 2 次；**15-18**. 实验 4 中的水、空白各 2 次；**B** 1702A 试剂 17 个循环扩增效果。**1**. 阳性样本（50 pg 小麦基因组 DNA）；**2-3**. 空白对照。

Note: **A** **1-6**. Detection of the PBS, water, blank in test 1, each repeated twice; **7-8**. Detection of the water in test 3, repeated twice; **9-14**. Detection of the PBS, water, and blank in test 2, each repeated twice; **15-18**. Detection of the water and blank in test 4, each repeated twice. **B** Detected by MALBAC technique with 17 cycles. **1**. Positive control (50 pg wheat genomic DNA); **2-3**. The blank control.

图 3 使用 MALBAC 技术对不同试剂、耗材外源 DNA 的检测结果

Fig. 3 Detection of possible DNA contamination in reagents or on materials with MALBAC technique

2.4 使用 SCoT 分子标记对扩增结果进行初步验证

既然试剂耗材没有产生明显的外源污染，那为什么使用 MALBAC 技术扩增时增加循环数或者使用 MDA 技术扩增时均出现了较明显的假阳性现象呢？其可能形成原因？我们首先使用 SCoT 分子标记来检测外源污染是来自其它外源物种基因还是由于引物多聚体形成。扩增结果显示（图 4），阴性对照和 MALBAC 技术扩增的样品均没有明显的多态性条带出现，而使用 MDA 技术扩增的样品使用引物 P17 和 P21 时，包含全部染色体的单个细胞（3 号）和单条染色体（5 号）有两个样品出现了较明显的扩增条带。说明这两个样品可能是真实外源基因的扩增。



注：**1-2**. 空白对照扩增产物（MDA 扩增产生的假阳性产物）；**3**. 使用 MDA 技术扩增的一个细胞的全部染色体（42 条）；**4-5**. 使用 MDA 技术扩增的单条小麦染色体；**6-7**. 使用 MALBAC 技术扩增的单条小麦染色体。

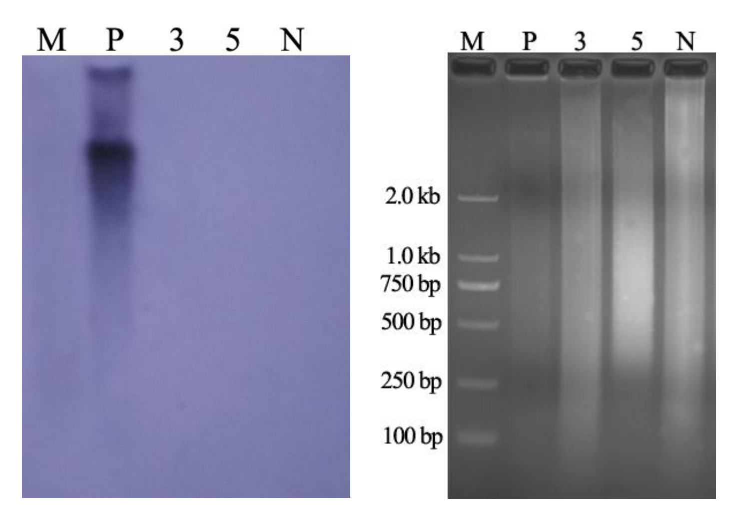
Note: **1-2**. Amplification products of blank control (false amplification with MDA); **3**. Amplification products of the whole 42 chromosomes in a cell of wheat with MDA technique; **4-5**. Amplification products of a single chromosome of wheat with MDA technique; **6-7**. Amplification products of a single chromosome of wheat with MALBAC technique.

图 4 使用 SCoT 引物对不同扩增样本进行检测

Fig. 4 Amplification of different samples with SCoT primers

2.5 使用 southern 印迹对扩增结果进行验证

为了进一步验证上述 3 号和 5 号样品是否为小麦染色体的真实扩增还是外源物种基因的扩增，我们对其进行了 Southern 杂交验证，使用小麦基因组 DNA 标记的探针对这两个样品的 MDA 扩增产物进行杂交，结果显示，除基因组阳性对照外，这两个样品及阴性对照均没有杂交信号出现（图 5）。因此证明该扩增产物可能是外源物种 DNA 污染造成。



注：**P**. 阳性对照（小麦基因组酶切产物）；**3**. 图 4 中 3 号（一个完整小麦细胞的全部 42 条染色体）扩增产物；**5**. 图 4 中 5 号（单条小麦染色体）扩增产物；**N**. 假阳性扩增产物。

Note: **P**. Positive control (Restricted wheat genomic DNA); **3**. The same amplification products as the above sample no.3 in Fig. 4 (the whole 42 chromosomes in a wheat cell); **5**. The same amplification products as the above sample no.5 in Fig. 4 (a single wheat chromosome); **N**. The false positive amplification.

图 5 染色体 MDA 扩增产物的 southern 印记杂交

Fig. 5 Southern-blotting of the amplification products of wheat chromosomes amplified by MDA technique

2.6 高通量测序和序列比对验证污染类型及可能来源

为了进一步证明该污染源的可能来源及其类型，我们对 3 号和 5 号样品的扩增产物进行了全基因组测序。并随机挑选委托安诺优达基因科技有限公司扩增的 2 个样品（MDA01 和 MDA02）进行建库测序。此 4 个样品的测序结果进行比对后，显示其均未比对到小麦基因组上，而是比对到人（Homo sapiens）、微生物（Propionibacterium、Cutibacterium acnes）、黑猩猩（Pan troglodytes）等物种上（表 3）。其中 Cutibacterium acnes （Propionibacterium acnes）和 Propionibacterium phage 两种微生物均可以栖息在人的皮肤上（Brigitte et al., 2018; Lood & Collin, 2011）。

表 3 染色体测序比对结果

Table 3 Results of samples blasted to NT database

样品名称 Samples	比对第一物种 Hit 1	比对第二物种 Hit 2
No.3	Homo sapiens	Unknown
No.5	Homo sapiens	Cutibacterium acnes
MDA01	Propionibacterium phage	Propionibacterium phage
MDA02	Homo sapiens	Pan troglodytes

3 讨论

分离单条染色体然后进行体外扩增，建立单条染色体 DNA 文库，对于构建高密度分子标记连锁图谱和分离重要基因、基因物理作图和染色体进化等研究具有重要应用价值。在高通量全基因组测序中，一些物种基因组比较复杂，多倍体、杂合程度高或者重复序列多等问题导致后续数列的组装和拼接困难，质量、效率低。如果能分离出单条染色体，针对单条染色体进行扩增和测序，则会大大降低物理图谱构建的难度。

近些年来，国内外多家单位尝试使用单细胞测序的技术进行单染色体测序研究，但目前还没有成功的报道，主要原因是外源污染的假阳性扩增严重。本研究在严格防控外源污染的基础上，针对单染色体测序过程中出现的假阳性问题进行研究，探讨其可能污染途径和来源，并提出个人观点：一、假阳性现象难以完全避免。单染色体的分离和体外扩增涉及较多步骤，每个步骤涉及使用较多试剂、耗材和不同操作空间，绝对控制外源污染困难较大。其次，在使用 MALBAC 技术进行扩增时，在第二轮使用较多的循环数会增加假阳性现象发生的几率；而使用 MDA 技术进行扩增时，阴性对照也往往产生假阳性现象（Yilmaz et al., 2010; Marcy et al., 2007）。两种单细胞测序技术对模板的扩增均具有较高灵敏度，假阳性的存在可能是因为极微量外源 DNA 在目标样品缺乏时被扩增或引物自身形成的引物多聚体现象，而如果目标样品存在并获得优先扩增的情况下，外源污染的扩增或多聚物的形成将会被抑制。另外，本研究在对假阳性产物进行测序分析时发现，污染物的来源于人体密切相关，其它来源的污染相对较少，说明对环境、试剂、耗材等的污染较易防控。但是人体无法使用常规方式对外源 DNA 进行降解和破坏。因此在实验过程中，要严格避免人体任何部位与实验试剂、耗材甚至操作环境的直接接触，要全程穿戴一次性鞋套、口罩、帽子、实验服等。最大限度的减少外源污染。二、单染色体扩增失败可能并不是因为模板量太小，而是染色体本身没有得到有效扩增。本研究中使用一个完整细胞的全部 42 条染色体进行扩增，同样没有获得目标样本的基因组扩增信息，而小麦基因组大小为 15.4~15.8Gb（Appels et al.，2018），大于已经成功进行单细胞测序的绝大多数物种。因此推测本实验使用单细胞技术进行小麦单染色体扩增失败的主要原因可能在于染色体的形态。染色体的高度浓缩超螺旋状态会影响组蛋白的去除及 DNA 变性，一般的裂解条件可能无法使 DNA 从这种超螺旋状态转变为线性的可以与引物有效结合的状态，无法有效启动复制。另外，染色体制备过程中残留的固定剂、染色剂等成分可能会对组蛋白消化和 DNA 聚合酶反应等造成影响。因此为成功使用单细胞测序技术进行单条染色体的体外扩增，建议从以下几个方面进行尝试：（1）整个操作过程必须保证完全的无菌环境，所使用的仪器、器皿等工具严格高压灭菌和紫外线灭菌；体外扩增试剂应选用经过严格无菌化处理的商品化试剂盒；实验用水和其它试剂必须进行严格的灭菌和质量检测，确保无外源 DNA 污染后方可使用；严格做好自身防护，减少人体裸露部位暴露在环境中的机会；全程设无菌水阴性对照；最好使用新建实验室和新的超净工作台等进行操作，且需将染色体分离和扩增两个环节在不同实验室分开进行，避免气溶胶的污染。（2）通过高盐缓冲液、使用蛋白酶 K 消化及延长消化时间等措施尽量去除组蛋白，同时综合运用生物酶（如拓扑异构酶等）、离心机械力等方法，尽可能的使染色体变为松散的线性状态。（3）评估染色体制备过程中不同药剂对后续试验的影响，选择最合适的染色体制备和染色方法，并争取在前处理过程中通过减少操作时间、中和反应和溶剂冲洗等措施降低或去除这种影响。建议使用较温和的方法获得染色体悬浮液后直接不经染色直接使用微细玻璃针（管）吸取分离，进行后续裂解和扩增反应。本研究团队在总结和深入解析单染色体测序失败原因的基础上，通过改进染色体悬浮液制备和分离方法，增加蛋白酶 K 消化等步骤，目前已成功分离和体外扩增了小麦的单条植物染色体，并经过了 southern 杂交验证，但显示杂交信号不是很强，目前正在进行质量评估，相关研究结果将在后续文章中进行报道。

本研究针对使用单细胞测序技术进行单染色体体外扩增和测序过程中普遍遇到的扩增失败和假阳性问题，进行了具体地分析和探讨，并提出了可行性建议，为进一步改进植物单染色体扩增技术提供借鉴。

参考文献：

APPELS, RUDI E, KELLYE S, et al., 2018. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome[J]. Science, 361(6403): aar7191. DOI: 10.1126/science.aar7191

BRIGITTE D, PECASTAINGS S, STEPHANE C, et al., 2018. Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: A brief look at the latest updates[J]. J Eur Acad Dermatol, 32(Suppl 1):5-14.

CHEN Q, ARMSTRONG KC, 1995. Characterization of a library from a single microdissected oat (*Avena sativa* L.) chromosome [J]. Genome, 38(4): 706-714.

COLLARD CY, MACKILL DJ, 2009. Start codon targeted(SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Mol Biol Rep, 27(1): 86-93.

DU Q, WANG HB, LIU KY, et al., 2015. Quantitative study of aerosol risk arising from laboratory experiments of pathogenic microorganisms [J]. Military Med Sci, 39(12): 926-928. [杜茜, 王洪宝, 刘克洋, 等, 2015. 病原微生物实验室实验操作产生气溶胶风险定量研究[J]. 军事医学，39(12): 926-928.]

HOSONO S, FFARQI AF, DEAN FB, et al., 2003. Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples[J]. Genom Res, 13(5): 954-964.

HUANG L, MA F, CHAPMAN A, et al., 2015. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications[J]. Annu Rev Genom Hum Genet, 16(1): 79-102.

LASKEN RS, 2007. Single-cell genomic sequencing using multiple displacement amplification[J]. Curr Opin Microbiol, 10(5): 510-516.

LI X, LI L, YAN J, 2015. Dissecting meiotic recombination based on tetrad analysis by single-microspore sequencing in maize[J]. Nat Comm, 6(1). doi:10.1038/ncomms7648

LOOD R, COLLIN M, 2011. Characterization and genome sequencing of two Propionibacterium acnes phages displaying pseudolysogeny[J]. BMC Genom, 12(1): 198.

LUO C, HE XH, CHEN H, et al., 2011. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers[J]. Biochem System Ecol, 39: 676-684.

MARCY Y, ISHOEY T, LASKEN RS, et al., 2007. Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells[J]. PLoS Genet, 3(9): 1702-1708.

NAVIN N, KEMDALL J, TROGE J, et al., 2011. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing[J]. Nature, 472(7341): 90-94.

TELENIUS H, CARTER NP, BEBB CE, et al., 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer[J]. Genom, 13(3): 718-725.

WANG FM, WANG P, TANG Q, et al., 2010. Control of exogenous contaminations in pomelo (*Citrus grandis* Osbeck) single chromosome LA-PCR-AFLP [J]. Chin J Trop Crop, 31(12): 2135-214. [王发明, 王平, 唐琦, 等. 2010. 柚（*Citrus grandis* Osbeck）单染色体 LA-PCR-AFLP 技术体系中外源污染的防控[J]. 热带作物学报，31(12):2135-2141.]

YILMAZ S, ALLGAIER M, HUGENHLTZ P, 2010. Multiple displacement amplification compromises quantitative analysis of metagenomes[J]. Nat Methods, 7(12): 943-944.

ZONG C, LU S, CHAPMAN AR, et al., 2012. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell[J]. Science, 338(6114): 1622-1626.